NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 103

MARIA VISINTINI ROMANIN

RICERCHE SUGLI ACIDI FENOLICI DELLE UVE E DEI VINI

NUOVI STUDI
DELLA
STAZIONE CHIMICO - AGRARIA SPERIMENTALE DI UDINE

PUBBLICAZIONE N. 103

MARIA VISINTINI ROMANIN

RICERCHE SUGLI ACIDI FENOLICI DELLE UVE E DEI VINI

STUDIO ESEGUITO CON IL CONTRIBUTO FINANZIARIO
DELLA REGIONE FRIULI-VENEZIA GIULIA

Arti Grafiche Friulane - Udine - 1968

RICERCHE SUGLI ACIDI FENOLICI DELLE UVE E DEI VINI

In questa nota — che continua la serie delle nostre ricerche sulle sostanze fenoliche dei vini friulani (2) (3) — vengono riferiti i risultati di indagini cromatografiche sugli acidi fenolici delle uve e dei vini.

Le ricerche sono state condotte su tre tipi di vino nero, opportunamente scelti per un diverso contenuto di composti antocianici e precisamente: vino Merlot, con un contenuto medio di antociani; vino Baco con contenuto elevato di diglucosidi antocianici fluorescenti; vino Lancellotta con contenuto elevatissimo di antociani. Per la valutazione delle variazioni che si possono verificare durante la vinificazione le determinazioni degli acidi fenolici, liberi e combinati, sono state eseguite anche sulle uve degli stessi vitigni da cui provenivano i vini.

Nel prospetto 1 sono riportati i dati analitici di alcune proprietà generali ritenute di interesse per la caratterizzazione dei vini agli effetti della presente ricerca: pH, grado alcoolico, acidità totale, acidità volatile, anidride solforosa totale, i valori di densità ottica a 420 e 520 mμ, i valori di « Intensità colorante » e di « Colore », i valori di V ottenuti con la reazione alla vanillina, i valori di LA per i tannini totali e infine i valori dei rapporti $\frac{V}{LA}$ indicanti lo stato di polimerizzazione delle catechine e dei leucoantociani.

Si è proceduto inoltre all'isolamento e all'identificazione cromatografica dei diglucosidi antocianici fluorescenti, dei flavonoli (miricetina, quercetina, canferolo), dei glucosidi dei flavonoli e di alcune catechine. I risultati sono riportati nel prospetto 2.

Per la identificazione e la determinazione degli acidi fenolici sono state applicate varie tecniche cromatografiche operando sempre in

ALCUNE CARATTERISTICHE CHIMICHE DEI VINI

Prospetto 1

	Merlot 1967	Baco 1967	Lancellotta 1967
pH	3.48	3.90	3.55
Alcool in volume %	10.90	9.90	9.00
Acidità totale (in ac. tartarico) ‰	6.60	8.10	9.00
Acidità volatile (in ac. acetico) ‰	0.592	0.964	0.362
Anidride solforosa totale mg‰	6.40	19.20	280.32 (*)
D_{420} (D.O. a 420 mμ)	0.159	0.351	1.505
D_{520} (D.O. a 520 mμ)	0.269	0.387	> 2.000
Intensità colorante $D_{420} + D_{520}$	0.428	0.738	> 3.505
Colore $\frac{D_{420}}{D_{520}}$	0.501	0.907	≤ 0.750
V (reazione alla Vanillina)	0.134	0.002	0.195
LA (per tannini totali)	0.077	0.050	0.227
$\frac{V}{LA}$ (per lo stato di polimerizzazione)	1.740	0.040	0.859
Tannini totali g‰	1.54	1.02	4.34

(*) In considerazione del particolare uso (taglio colorato) il vino Lancellotta è stato trattato all'origine con una elevata dose di SO_2.

PRESENZA DI ALCUNI FLAVONOIDI NEI VINI

Prospetto 2

	Merlot	Baco	Lancellotta
Diglucosidi antocianici fluorescenti	ass.	forte pres.	ass.
Glucosidi dei flavonoli	12+	15+	16+
Miricetina	4+	6+	7+
Quercetina	7+	9+	9+
Canferolo	3+	4+	2+
Macchia rossa Rf 0.18-0.22 (Reaz. con Vanill.)	+	++	++
Macchia rossa Rf 0.38-0.39 (Reaz. con Vanill.)	++	++	++
dl-gallocatechina (Reaz. con Vanill.)	++	++	++
l-epicatechina (Reaz. con Vanill.)	++	++	+++
d-catechina (Reaz. con Vanill.)	+++	+++	++
Macchia viola Rf 0.78-0.80 (Reaz. con Vanill.)	+++	+	++
Macchia viola Rf 0.84 0.88 (Reaz. con Vanill.)	+++	++	++

confronto con combinazioni di test formate da sette acidi benzoici (p-ossibenzoico, protocatechico, vanillico, gallico, siringico, salicilico, gentisico), da cinque acidi cinnamici (p-cumarico, caffeico, ferulico, o-cumarico, m-cumarico) e da due depsidi (acido clorogenico ed ellagico).

La maggior parte degli acidi fenolici è solubile in etere etilico: le determinazioni sono state perciò eseguite sugli estratti eterei delle uve e dei vini. Soltanto per la ricerca dell'acido clorogenico e dell'acido ellagico, non solubili in etere, l'estrazione è stata eseguita con acetato di etile, Sugli stessi estratti di acetato di etile sono stati determinati anche i flavonoli (agliconi e glucosidi) e le catechine.

Materiali e metodi

Estrazione con etere degli acidi fenolici liberi: ml 200 di vino (nel caso delle uve cc. 200 di estratto acquoso acido per HCl 1%) vengono estratti per 5 volte con 100 ml di etere etilico per volta in imbuto separatore. Dagli estratti riuniti viene scacciato l'etere in evaporatore rotativo a temperatura ambiente e il residuo ottenuto viene ripreso con alcuni ml di alcool a 95°.

Estrazione con etere degli acidi fenolici combinati: i 200 ml di vino che hanno subito l'estrazione precedente vengono trattati con 40 ml di NaOH 10N e poi sottoposti alla saponificazione mantenendoli per 4 ore a temperatura ambiente in atmosfera di azoto (alcuni acidi fenolici sono facilmente ossidabili in ambiente alcalino). Dopo riacidificazione con HCl concentrato, raffreddando in acqua ghiacciata, si procede all'estrazione con etere etilico e alla concentrazione come sopra indicato per gli acidi liberi.

Estrazione con acetato di etile: ml 600-700 di vino vengono estratti in imbuto separatore per 5 volte con 100 ml di acetato di etile per volta. Le fasi organiche riunite vengono concentrate in evaporatore rotativo e il residuo viene ripreso con pochi ml di alcool a 95°.

Sugli estratti alcolici contenenti separatamente gli acidi fenolici liberi e combinati vengono eseguite le ricerche qualitative e quantitative relative alla maggior parte degli acidi fenolici mentre sugli estratti con acetato di etile vengono ricercati flavonoli, catechine e alcuni acidi fenolici (in particolare: l'acido clorogenico e l'acido ellagico).

Sono state adottate diverse tecniche cromatografiche: mono e bidimensionali su carta W1 con vari solventi, mono e bidimensionale su strato sottile di Gel di silice G, di Poliamide, di Cellulosa MN 300 e di miscele di Poliamide e Cellulosa, con solventi organici e acquosi (1, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 18, 19, 22).

Prospetto 3

TECNICHE CROMATOGRAFICHE ADOTTATE PER LA RICERCA DEGLI ACIDI FENOLICI NEI VINI

	Solventi	Durata dello sviluppo (di larga indicazione)	Rivelatori	Osservazioni su separazione delle macchie	Osservazioni su colorazione delle macchie	Note sull'utilità della tecnica per:
SU CARTA W1.						
Monodimensionale:						
Ascendente	Benzene-Ac. Acetico-Acqua (6:7:3)	5 h	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	buona	tutti gli acidi fenolici
Ascendente	Toluolo-Ac. Acetico-Acqua (4:1:5)	5 h	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	mediocre	buona	la valutazione Rf composto X
Discendente	Benzene-Ac. Acetico-Acqua (6:7:3)	6 h	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	buona	tutti gli acidi fenolici
Discendente	Toluolo-Ac. Acetico-Acqua (4:1:5)	6 h	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	mediocre	buona	la valutazione Rf composto X
Bidimensionale:	1ª direz.:BAW fase org., 2ª direz.:Ac. Ac. 2%	16 h, 6 h	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	discreta	buona	estratti con acetato di etile
Bidimensionale:	1ª direz.:Benz.-Ac. Ac.-Acqua (6:7:3), 2ª direz.:Ac. Ac. 2%	6 h, 6 h	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	discreta	buona	clorogenico e isomeri trans-cis
SU STRATO SOTTILE:						
Gel di silice G Spess. 250 μ	Benzene-Alcool metilico-Ac.Ac. (45:8:4)	30'	Diazobenzidina	buona	mediocre	confronto Rf bibliog.
Gel di silice G Spess. 250 μ	Benzene-Alcool metilico-Ac.Ac. (45:8:4)	30'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	mediocre	confronto Rf bibliog.
Gel di silice G Spess. 250 μ	Clorof. - Alcool Metilico - Ac. Formico 85% (85:10:5)	30'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	mediocre	confronto Rf bibliog.
Gel di silice G Spess. 250 μ	Alcool isopr.-Ammoniaca-Acqua (8:1:1)	45'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	discreta	mediocre	confronto Rf bibliog.

Gel di silice G+Cellulosa (g 10+g 10+ cc 80H_2O) Spess. 250 μ	Clorof.-Ac. Acetico-Acqua (4:1:1)	45'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	mediocre	buona	confronto Rf bibliog.
Poliamide Spess. 250 μ	Benz.-Acool Metilico-Ac. Ac. (45:8:4)	90'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	discreta	ac. vanillico in particolare
Poliamide + Cellulosa (g 8+g 4+60cc CH_3OH+1 cc Ac. Ac.) Spess. 250 μ	Benz.-Acool Metilico-Ac. Ac. (45:8:4)	50'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	buona	ac. ferulico, siringico, vanillico
Poliamide + Cellulosa (g 8+g 4+60cc CH_3OH+1 cc Ac. Ac.) Spess. 250 μ	Benzene-Ac. Acetico-Acqua (6:7:3)	60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	buona	ac. ferulico, siringico, vanillico
Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	Acool isopr.-Ammoniaca-Acqua (8:1:1)	50'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	discreta	discreta	isomeri trans-cis
Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	Ac.Acetico 2%	60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	ottima	ottima	tutti gli ac. fenolici e isomeri
Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	BAW fase acquosa dil. a metà	60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	ottima	ottima	tutti gli ac. fenolici e isomeri
Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	Acido formico 1%	60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	ottima	ottima	tutti gli ac. fenolici e isomeri
Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	Glicerina 2%	60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	ottima	ottima	tutti gli ac. fenolici e isomeri
Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	Cloruro di sodio 3% in HCl 0. 1. N	60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	ottima	ottima	tutti gli ac. fenolici e isomeri
Bidimens. su Poliamide+Cellulosa Spess. 250 μ	1ª direz.:Benz-Ac. Ac.-H_2O (6:7:3) 2ª direz.:Benz.-Alc. Met.-Ac. Ac. (45:8:4)	60', 50'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	discreta	estratti con acetato di etile
Bidimens. su Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	1ª direz.:BAW fase org., 2ª dir. Ac. Ac. 2%	2 h, 60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	ottima	ac. clorogenico
Bidimens. su Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	1ª direz.:Ac Ac. 2%, 2ª dir. Glicerina 2%	60', 60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	ottima	ac. gentis. p-ossibenz., vanill.
Bidimens. su Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	1ª direz.:Ac. formico 1%, 2ª dir.:BAW fase acquosa dil.	60', 60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	buona	ottima	ac. protocatechico in part.
Bidimens. su Cellulosa MN 300 Spess. 500 μ	1ª direz.:Glicerina 2%, 2ª dir.: NaCl 3% in HCl O. 1 N	60', 60'	p-nitroanilina diaz.+Na_2CO_3	ottima	ottima	ac. gentisico in particolare

Nel prospetto 3 sono riportate alcune essenziali notizie sulle tecniche usate. I tempi per lo sviluppo dei cromatogrammi sono ovviamente di larga indicazione.

La cromatografia bidimensionale su strato sottile di cellulosa è stata eseguita con coppie di vari solventi acquosi sia per ottenere una sicura identificazione di alcuni acidi difficilmente separabili con i comuni solventi, sia per mettere in evidenza le eventuali forme « trans » e « cis » degli acidi fenolici cinnamici presenti normalmente nei vini (caffeico, p-cumarico e ferulico) (Fig. 1, 2, 3).

Per separare gli isomeri « trans » e « cis » degli acidi cinnamici si deve ricorrere a solventi acquosi giacchè con i solventi organici non si ottiene la loro separazione.

I vari cromatogrammi sono stati sempre osservati alla luce ultravioletta (254 mμ) prima e dopo il trattamento con ammoniaca e alla luce normale dopo i trattamenti con cloruro ferrico, con acido molibdico, con diazobenzidina, (10), con p-nitroanilina e con p-nitroanilina + Na_2CO_3 (12) (18).

Le soluzioni alcoliche provenienti dagli estratti in acetato di etile sono state sottoposte a cromatografia bidimensionale su carta W1 e su strato sottile di cellulosa MN 300 con i solventi BAW fase org. e Ac. Acetico 2% eseguendo separatamente a) un cromatogramma per i flavonoli con osservazione alla luce U.V. e dopo trattamento alcalino; b) un cromatogramma per le catechine messe in evidenza col reattivo alla vanillina; c) un cromatogramma per gli acidi fenolici con un trattamento al $FeCl_3$; d) un cromatogramma per gli acidi fenolici con trattamento con p-nitroanilina e poi con Na_2CO_3.

L'osservazione di questi cromatogrammi è risultata utile per la valutazione dei numerosi composti fenolici che passano negli estratti in acetato di etile e che dato il loro rilevante numero possono influenzare reciprocamente i valori dei singoli Rf.

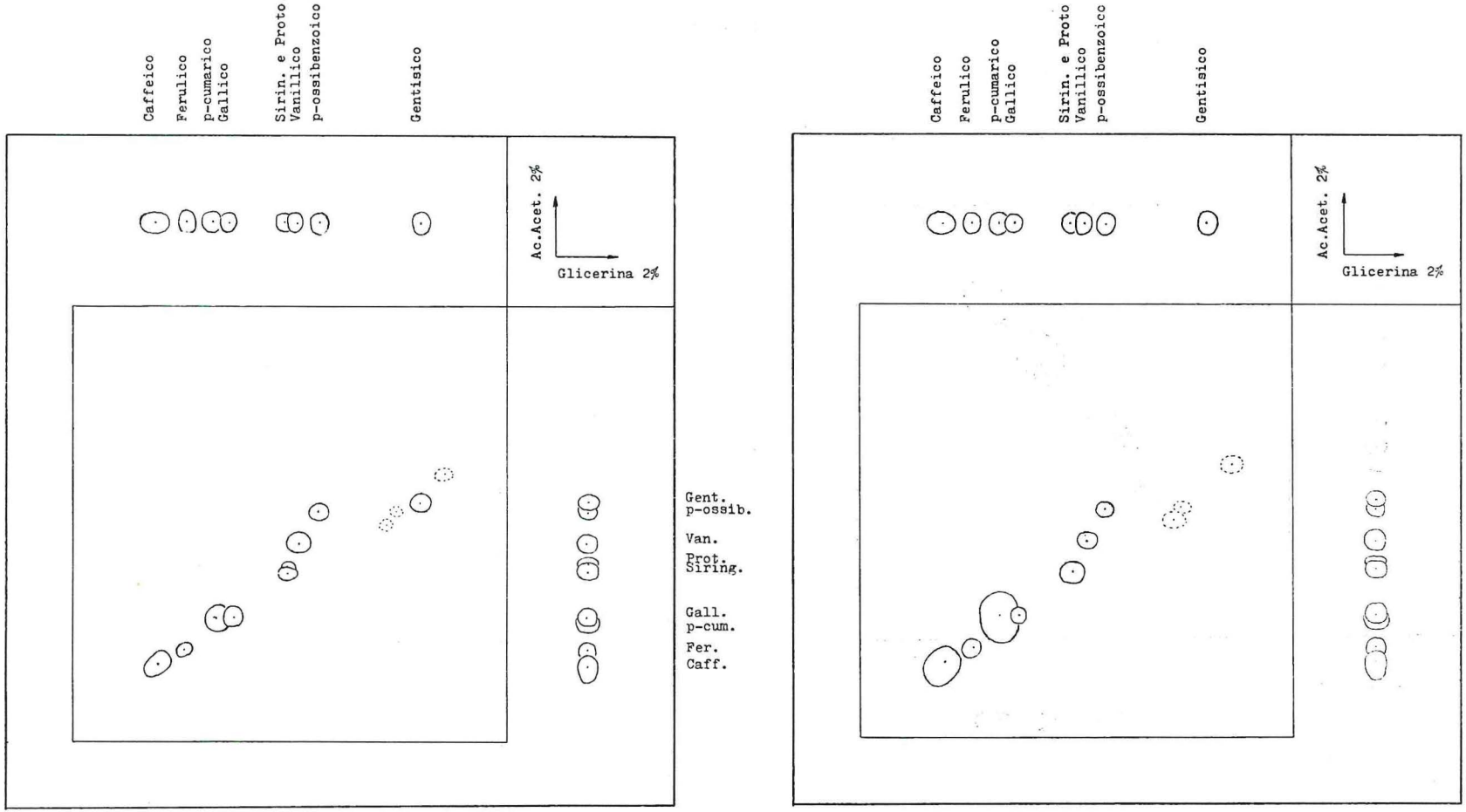
Risultati

Nei tre vini esaminati sono stati identificati e dosati per densitometria i seguenti acidi fenolici:

Benzoici: p-ossibenzoico, protocatechico, vanillico, gallico, siringico, gentisico;

Cinnamici: p-cumarico, caffeico, ferulico.

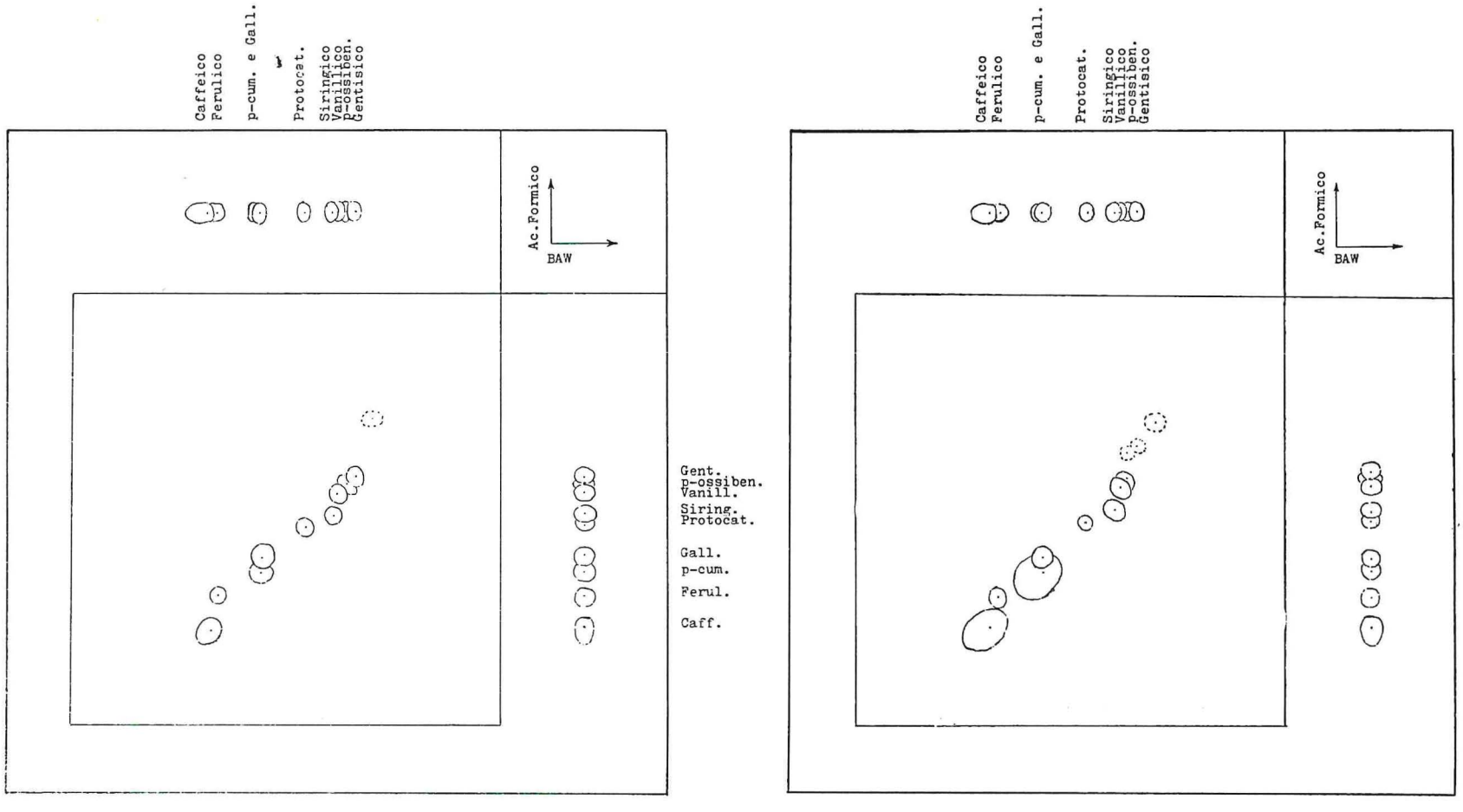
Non è stato possibile stabilire con sicurezza la presenza dell'acido salicilico (o-ossibenzoico) e dell'acido clorogenico.



Ac. fenolici liberi

Ac. fenolici combinati

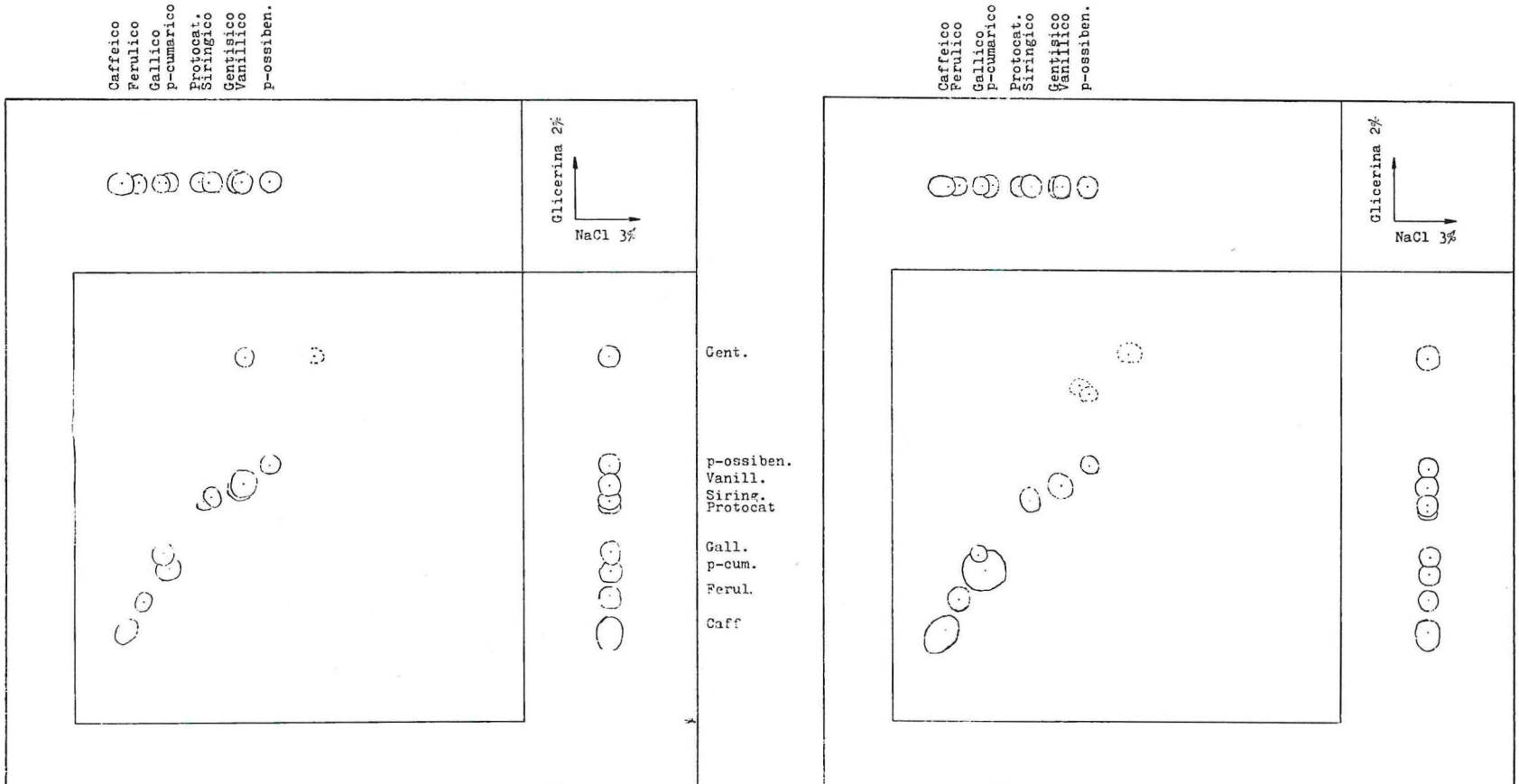
Fig. 1 - Cromatografia bidimensionale (1ª direz. Ac. Ac. 2%, 2ª direz. Glicerina 2%) su strato sottile di cellulosa MN 300 di acidi fenolici estratti da vino Merlot.



Ac. fenolici liberi

Ac. fenolici combinati

Fig. 2 - Cromatografia bidimensionale (1ª direz. Ac. formico 1%, 2ª direz. BAW fase acquosa dil.) su strato sottile di cellulosa MN 300 di acidi fenolici estratti da vino Merlot.



Ac. fenolici liberi

Ac. fenolici combinati

Fig. 3 - Cromatografia bidimensionale (1ª direz. Glicerina 2%, 2ª direz. NaCl 3% in HCl 0.1 N) su strato sottile di cellulosa MN 300 di acidi fenolici estratti da vino Merlot.

E' stato riscontrato sempre presente in quantità sensibile un composto non identificato di natura fenolica (*).

Le ricerche sono state eseguite sempre in confronto con acidi fenolici puri della Ditta Fluka (Foto 1 della Fig. 4).

L'acido o-cumarico è risultato sicuramente assente in tutti i vini esaminati (23).

Esiste invece il dubbio della presenza dell'acido m-cumarico in minime tracce, in alcuni campioni.

Con la cromatografia monodimensionale sono stati riscontrati vari acidi fenolici ricorrendo all'osservazione alla luce U.V. prima e dopo trattamento con ammoniaca (salicilico, gentisico, caffeico, ferulico e o-cumarico risultati luminosi e diversamente colorati), all'osservazione dopo trattamento con cloruro ferrico (alcuni acidi presentano colori inconfondibili), all'osservazione dopo trattamento con p-nitroanilina (molti danno colorazioni gialle, l'ac. siringico dà colorazione arancione, l'ac. ferulico dà colorazione rossa), all'osservazione dopo trattamento con p-nitroanilina + Na_2CO_3 (tutti assumono colori caratteristici, particolarmente intensi e inconfondibili su carta e su strato sottile di cellulosa) (Foto 1 della fig. 4).

Nel prospetto 4 sono indicate le reazioni cromatiche degli acidi fenolici presi in considerazione e i valori di Rf ottenuti con i vari solventi usati.

Con la cromatografia bidimensionale su strato sottile di cellulosa è stato possibile risolvere alcuni casi dubbi riguardanti:

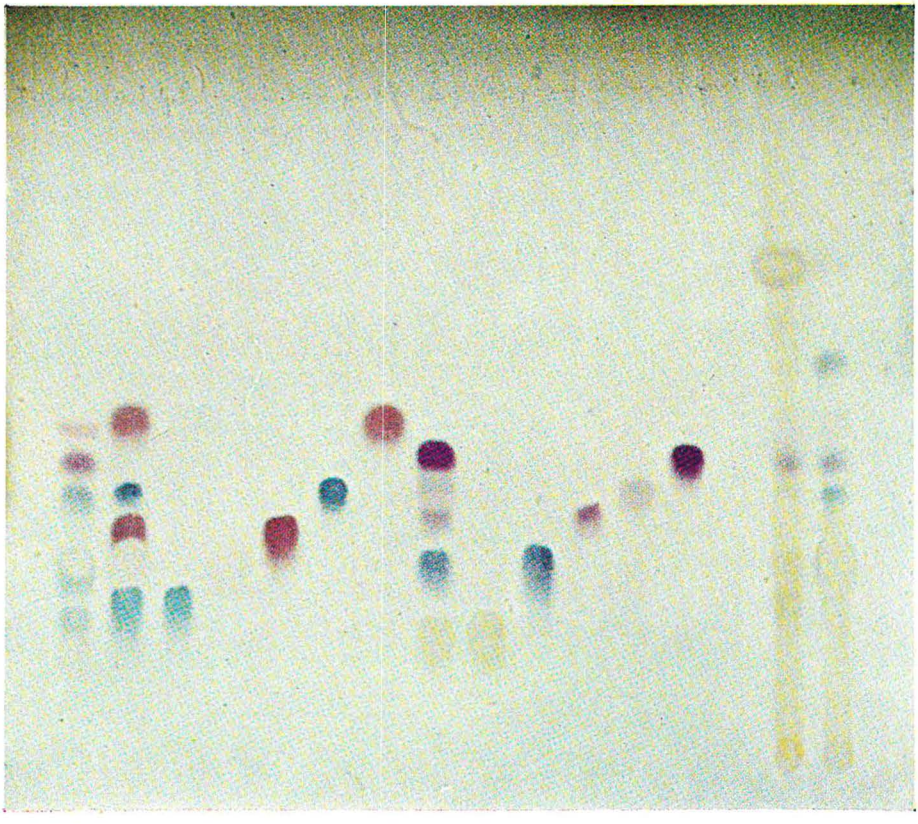
1) l'ac. gentisico e le forme cis degli acidi caffeico, ferulico e p-cumarico, mediante la soluzione al 2% di acido acetico in prima direzione, e la soluzione di glicerina al 2% in seconda direzione;
2) l'ac. p-ossibenzoico, l'ac. gentisico e le forme cis degli acidi cinnamici, mediante la soluzione al 2% di glicerina in prima direzione e la soluzione al 3% di NaCl in seconda direzione;
3) l'ac. protocatechico mediante la soluzione all'1% di ac. formico saturo di butanolo in prima direzione e BAW fase acquosa diluita al 50% in seconda direzione.

Nelle fig. 1, 2, 3 sono disegnati i cromatogrammi bidimensionali su strato sottile di cellulosa sviluppati con le coppie di solventi acquosi, relativi all'estratto di vino Merlot in confronto a miscele di ac. fenolici puri.

Nel prospetto 5 vengono riportate le quantità di acidi fenolici — liberi, combinati e totali —, trovate nei tre vini esaminati. La valutazione quantitativa è stata effettuata per confronto diretto con dosi

---

(*) Probabilmente trattasi di tirosolo: le ricerche per la identificazione sono in corso (23).

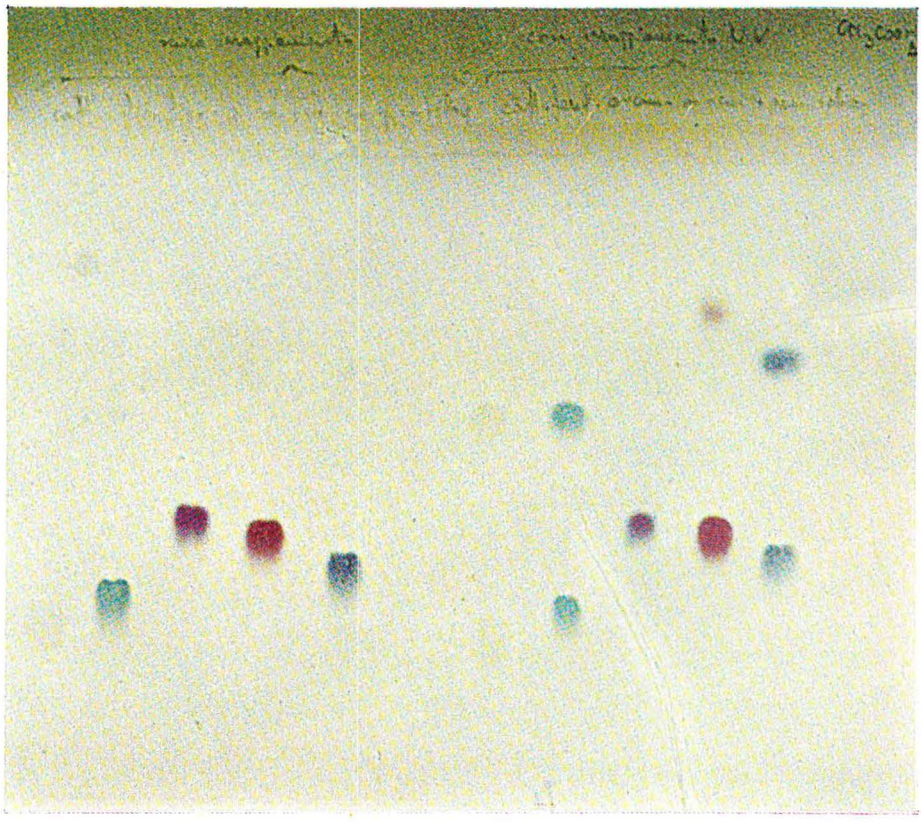


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

Fig. 4 - Cromatogramma su strato sottile di Cellulosa MN 300, solvente Acido Acetico 2%, rivelatore p-nitroanilina + Na_2CO_3.

1) Miscela 9 ac. fenolici (senza o e m-cumarico)
2) Miscela 5 acidi fenolici
3) Ac. ferulico Rf 0.22
4) Ac. Gallico Rf 0.29
5) Ac. m-cumarico Rf 0.31
6) Ac. siringico Rf 0.38
7) Ac. p-ossibenzoico Rf 0.51
8) Miscela 6 acidi fenolici
9) Ac. caffeico Rf 0.18
10) Ac. p-cumarico Rf 0.28
11) Ac. o-cumarico Rf 0.34
12) Ac. protocatechico Rf 0.40
13) Ac. vanillico Rf 0.45
14) Ac. gentisico Rf 0.53
15) Estratto etereo vino Merlot (Ac. fenolici liberi)
16) Estratto etereo vino Merlot (Ac. fenolici combinati)

In 1 e 2 è ben visibile l'influenza dell'ac. gallico sull'ac. p-cumarico; in 1 l'influenza dell'ac. gentisico sull'acido p-ossibenzoico; in 15 è rilevante la quantità di tirosolo (Rf 0.84); in 16 è notevole la quantità della forma cis dell'ac. p-cumarico.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Fig. 5 - Cromatogramma su strato sottile di cellulosa MN 300, solvente Ac. Acetico 2%, rivelatore p-nitroanilina + Na_2CO_3.

Soluzioni eteree mantenute al buio di:

1) Ac. caffeico
2) Ac. ferulico
3) Ac. o-cumarico
4) Ac. m-cumarico
5) Ac. p-cumarico
6) Ac. clorogenico

Soluzioni eteree per 2 ore sotto luce U.V. (254mμ) di:

7) Ac. caffeico (Rf 0.18 - 0.50)
8) Ac. ferulico (Rf 0.22 - 0.53)
9) Ac. o-cumarico (Rf 0.34 - —)
10) Ac. m-cumarico (Rf 0.31 - 0.68)
11) Ac. p-cumarico (Rf 0.28 - 0.61)
12) Ac. clorogenico (Rf 0.45 - 0.66)

crescenti di ciascun acido fenolico puro sui cromatogrammi su carta W1 con solvente Benzene-Ac. Acetico-H_2O (6:7:3) e su stratto sottile di cellulosa con solvente Ac. Acetico 2%.

Anche dalle uve fresche (bucce) sono stati isolati sia gli acidi fenolici liberi che gli ac. fenolici combinati: nel prospetto 6 sono riportate le quantità relative messe in confronto a quelle trovate nei vini degli stessi vitigni.

La valutazione quantitativa degli acidi cinnamici (prospetti 5 e 6) è stata eseguita sui cromatogrammi sviluppati con solventi organici: comprende perciò sia la forme trans che le forme cis eventualmente presenti. Non si è ritenuto opportuno valutare separatamente le due forme isomere eventualmente presenti nelle uve e nei vini per le ragioni che verranno esposte più avanti.

Dall'esame dei risultati ottenuti si può rilevare:

A) nelle uve

— sono risultati assenti l'ac. protocatechico, l'ac. salicilico, l'ac. gentisico, e il composto X;
— la quantità complessiva di acidi fenolici liberi è molto bassa;
— la quantità degli acidi combinati è elevata per quanto riguarda l'ac. p-cumarico, è rilevante per l'ac. vanillico, gallico e caffeico, è sensibile per l'ac. siringico e ferulico.

B) nei vini

— il numero di ac. fenolici è maggiore di quello presente nelle uve;
— fra gli acidi liberi è stato trovato in quantità sensibili l'ac. gentisico. In tutti i vini è risultato presente in forte quanità il composto X; sia questo composto non identificato sia l'ac. gentisico sono risultati sempre assenti nelle uve.
Evidentemente questi due composti si formano durante la fermentazione. Secondo Ribereau-Gayon (12) durante la fermentazione si formerebbero, oltre all'acido gentisico e al composto X, anche piccole quantità di ac. salicilico. Nei vini da noi esaminati, come è stato riferito anche in precedenza, la presenza di questo acido non è stata accertata;
— fra gli acidi combinati l'ac. p-cumarico è risultato sempre presente in fortissima quantità, seguito dall'acido caffeico e dagli acidi ferulico, vanillico e siringico, mentre il composto X è stato riscontrato presente solo in minime tracce, gli acidi salicilico e clorogenico sicuramente assenti.

Da alcune ricerche in corso sui vini bianchi friulani, analoghe a quelle riferite in questa nota sui vini neri, risulterebbe che nei vini bianchi: a) l'ac. gentisico e il composto X si trovino sempre in quantità praticamente pari a quelle riscontrate in media nei vini neri; b) gli ac. gallico, protocatechico, p-ossibenzoico, caffeico, ferulico e

VALORI DI Rf E REAZIONI CROMATICHE DI ACIDI

		Rf su carta W1		Rf. su strato sottile		
		Ascendente Benz. - Ac. Ac. - Acqua	Discendente Benz. - Ac. Ac. - Acqua	Ac. Ac. 2%	BAW fase Acquosa	Ac. Formico
Benzoici C_6-C_1						
p-ossibenzoico	(4, ossibenzoico)	0.44	0.28	0.51	0.63	0.58
protocatechico	(3, 4 diossibenzoico)	0.07	0.04	0.39	0.54	0.48
vanillico	(4 ossi, 3 metossibenzoico)	0.77	0.63	0.44	0.61	0.56
gallico	(3, 4, 5 triossibenzoico)	0.007	0.006	0.28	0.43	0.39
siringico	(4 ossi, 3, 5 dimetossibenzoico)	0.74	0.58	0.37	0.60	0.50
salicilico-o-ossib.	(2 ossibenzoico)	0.86	0.80	0.67	0.65	0.52
gentisico	(2, 5 diossibenzoico)	0.19	0.13	0.54	0.65	0.59
Cimamici C_6-C_3 (*)						
p-cumarico	(4 ossicinnamico)	0.53	0.34	0.29-0.62	0.43-0.69	0.36-0.
caffeico	(3, 4 diossicinnamico)	0.09	0.05	0.17-0.50	0.31-0.63	0.23-0.
ferulico	(4 ossi, 3 metossicinnamico)	0.78	0.60	0.22-0.53	0.33-0.65	0.30-0.
o-cumarico	(2 ossicinnamico)	0.64	0.46	0.34- —	0.51- —	0.46-
m-cumarico	(3 - ossicinnamico)	0.56	0.39	0.30-0.68	0.48-	0.44-
Depside						
clorogenico	(3 - caffeoilchinico)	—	—	0.45-0.67	0.61-	057.-

(*) Il primo valore di Rf si riferisce alla forma trans e il secondo alla forma cis.

A = arancione; B = bleu; Br = bruno; G = giallo; Gr = grigio; O = verde oliva.

R = rosso; Ro = rosa; V = verde; Vi = violetto.

c = chiaro; s = scuro; l = luminoso; o = opaco.

di cellulosa MN 300			Reazioni cromatiche						Strato sottile di poliam. e cell.			Strato sottile di gel di silic	
									Rf Rf coloraz.			Rf coloraz.	
Glicerina 2%	NaCl 3%	Acool isopropr. Ammoniaca Acqua	U.V.	U.V. $+NH_3$	$FeCl_3$ 2%	Acido fosfo-molibdico	p-nitroanilina diazotata	p-nitroanilina diazotata $+Na_2CO_3$	Benzene Ac. Ac. Acqua	Benzene Ac. Ac. Alc Met	p-nitroanilina diazotata $+ Na_2CO_3$	Benzene Metanolo Ac. Acetico	Diazoben-zidina
.57	0.44	0.19	o	o	G	—	G-c	R	0.15	0.26	Ro	0.51	G
.43	0.31	0.05	B-o	o	V	V-O	G	Gr-B	0.06	0.10	Gr	0.31	Br
.50	0.38	0.12	o	o	G	B-Gr	G	Vi	0.56	0.54	Vi	0.60	R-Br
.30	0.20	0.04	o	o	Gr	Gr	G	Br	0.001	0.003	G	0.16	Br
.49	0.29	0.08	s	s	G-Br	B-Gr	G-A	B	0.65	0.66	B	0.61	A
.87	0.46	0.74	l	l	Vi	—	—	—	0.60	0.66	—	0.68	—
.76	0.38	0.57	l	l	G	B-Gr	G-c	Bi	0.07	0.19	Bi-Gr	0.38	A
-0.82	0.21-0.53	0.25-0.35	o	l-B	G	B	G-c	B	0.20	0.31	O	0.52	Br
-0.72	0.12-0.40	0.06-0.14	l-V	l-G-V	V-Gr		G	Br	0.08	0.15	Br	0.32	G-Br
-0.74	0.15-0.42	0.14-0.24	l-B	l-Bc	Br	Gr-V	Ro	B-c	0.56	0.58	V-B	0.63	Gr-Br
0-	— 0.28-	— 0.40- —	l-B	l-G	G-Br	B	G	R-Vi	0.19	0.30	Vi	0.54	R-Br
-	0.26-	0.45-0.53	l	l	G	—	G	R	0.26	0.43	R	0.53	G-Br
-	0.35-	—	l	l-G-V	O	B	G	Br	—	—	Br	—	G-Br

Prospetto 5

ACIDI FENOLICI LIBERI, COMBINATI E TOTALI
CONTENUTI NEI VINI (mg/l)

	Merlot			Baco			Lancellotta		
	liberi	comb.	totali	liberi	comb.	totali	liberi	comb.	totali
Benzoici:									
p-ossibenzoico	0.4	0.8	1.2	0.8	0.2	1.0	0.8	0.9	1.7
protacatechico	0.1	?	0.1	0.1	?	0.1	0.2	?	0.2
vanillico	0.8	1.4	2.2	0.3	0.9	1.2	0.8	2.7	3.5
gallico	4.2	2.5	6.7	5.8	1.7	7.5	3.3	2.2	5.5
siringico	0.3	1.8	2.1	0.2	1.4	1.6	0.3	2.2	2.5
salicilico	?	?	?	?	?	?	?	?	?
gentisico	0.2	ass.	0.2	0.7	ass.	0.7	tr	ass.	tr
Cinnamici:									
p-cumarico	0.2	7.5	7.7	0.3	8.3	8.6	0.8	16.6	17.4
caffeico	0.8	5.0	5.8	0.2	4.2	4.4	0.8	10.0	10.8
ferulico	0.1	0.3	0.4	0.1	1.7	1.8	0.2	5.8	6.0
clorogenico composto X	8+	1+	9+	4+	1+	5+	4+	1+	5+

prospetto 6

ACIDI FENOLICI LIBERI E COMBINATI NELLE UVE E NEI VINI
(valutazioni quantitative approssimate di confronto)

	Bucce						*Vini*					
	Merlot		Baco		Ancellotta		Merlot		Baco		Lancellotta	
	liberi	comb.	liberi	comb.	liberi	comb.	liberi	comb.	liberi	comb.	liberi	comb.
p-ossibenzoico	ass.	1+	ass.	tr	1+	2+	1+	1+	1+	2+	1+	2+
protocatechico	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	1+	?	1+	?	2+	?
vanillico	1+	4+	1+	3+	1+	5+	2+	3+	1+	2+	1+	4+
gallico	ass.	3+	ass.	3+	1+	5+	4+	2+	5+	2+	4+	3+
siringico	1+	2+	1+	1+	1+	4+	4+	2+	3+	2+	2+	5+
salicilico	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	?	ass.	?	ass.	?	ass.
gentisico	ass.	ass	ass.	ass.	ass.	ass.	1+	ass.	3+	ass.	tr	ass.
p-cumarico	1+	8+	1+	8+	1+	16+	1+	8+	1+	8+	2+	16+
caffeico	1+	3+	2+	3+	2+	6+	2+	6+	1+	5+	2+	12+
ferulico	ass.	1+	ass.	2+	ass.	4+	tr	2+	tr	4+	2+	6+
clorogenico (*)							tr ?	ass.	?	ass.	?	ass.
composto X	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	ass.	8+	1+	4+	1+	4+	1+

(*) L'ac. clorogenico non viene estratto dall'etere e pertanto è stato ricercato sugli estratti in ac. di etile ottenuti dai vini e dagli estratti cloridrici delle bucce.

p-cumarico siano invece presenti sempre in quantità inferiori di quelle trovate nei vini neri; c) l'ac. siringico e l'ac. vanillico siano sempre praticamente assenti o presenti in tracce.

Si osserva che il vino Lancellotta che contiene quantità molto elevate di antociani (si confrontino i dati del colore e della intensità colorante nel prospetto 1) contiene invece quantità molto basse di ac. gentisico e del composto X. Questa osservazione ci porta a pensare che tale condizione possa essere non semplicemente casuale.

Forme isomere degli acidi cinnamici

In considerazione del fatto che gli acidi cinnamici possono esistere nelle forme isomere trans e cis cromatograficamente separabili soltanto con solventi acquosi, si è creduto opportuno di eseguire alcune preventive prove cromatografiche con acidi puri (forniti dalla Ditta Fluka) nella forma termodinamicamente più stabile.

Le ricerche sono state effettuate con cinque acidi cinnamici (o-cumarico, m-cumarico, p-cumarico, caffeico, ferulico) e un depside (clorogenico).

A) Cromatografia monodimensionale. Le soluzioni eteree, preparate di fresco, di ciascun acido sono state divise in due porzioni di cui una è stata tenuta al buio, l'altra è stata invece sottoposta per una durata di due ore ad irradiazione con luce U.V. (254 mμ). Le due serie di soluzioni sono state separatamente cromatografate su strato sottile di cellulosa con solvente ac. acetico 2%. Nei cromatogrammi delle soluzioni mantenute al buio non si sono osservati sdoppiamenti delle macchie dovuti alla formazione dell'isomero cis dei vari acidi. Nei cromatogrammi delle soluzioni irradiate si è invece verificato lo sdoppiamento delle macchie di tutti gli acidi eccettuato l'ac. o-cumarico. L'acido o-cumarico non può esistere nella forma cis libera.

Durante l'irradiamento si sono formate le forme isomere « cis » messe in evidenza dalla cromatografia con solvente acquoso. Le forme « trans » hanno sempre Rf più basso delle corrispondenti forme « cis » (Foto 2 della fig. 5).

La quantità totale di ogni singolo acido dopo l'irradiamento U.V. di due ore appare formata da circa il 60% di forma trans e il 40% di forma cis.

B) Cromatografia bidimensionale. E' stata eseguita su strato sottile di cellulosa M N 300 (spess. 0.5 mm) con solventi acquosi: in 1ª direzione ac. acetico 2%, in 2ª direzione glicerina 2%. Le prove sono state effettuate con soluzioni degli acidi cinnamici puri caffeico, ferulico, p-cumarico — di norma sempre presenti nei vini — sottoposte preventivamente ad irradiamento U.V. di due ore.

Dopo lo sviluppo in 1ª direzione (Fig. 6/A) si ottengono due gruppi di macchie: un gruppo, indicato nel disegno con le lettere a) b) c), riguardante le forme trans rispettivamente dell'ac. caffeico, dell'ac. ferulico e dell'ac. p-cumarico, e un gruppo, indicato nel disegno con le lettere a') b') c'), riguardante le forme cis degli stessi acidi.

Dopo lo sviluppo in 2ª direzione (Fig. 6/B) si osservano al posto dei due precedenti gruppi, quattro gruppi di macchie di cui due corrispondenti a forme trans e due a forme cis. Evidentemente dopo la prima separazione degli isomeri si è verificata una ulteriore formazione di isomeri cis dagli isomeri trans. Si può inoltre rilevare che una parte delle forme cis ha ripreso la forma trans.

Questo secondo equilibrio fra le forme trans e le forme cis è stato raggiunto nel breve tempo intercorso fra lo sviluppo in 1ª direzione e lo sviluppo in 2ª direzione, durante l'essicamento del cromatogramma e il rapidissimo suo controllo alla luce U.V. Ovviamente quest'ultima operazione deve essere omessa.

Da queste prove preventive, e da altre qui non descritte, eseguite con prodotti puri della forma trans degli acidi cinnamici normalmente presenti nei vini abbiamo ottenuto le seguenti indicazioni utili agli effetti delle nostre ricerche:

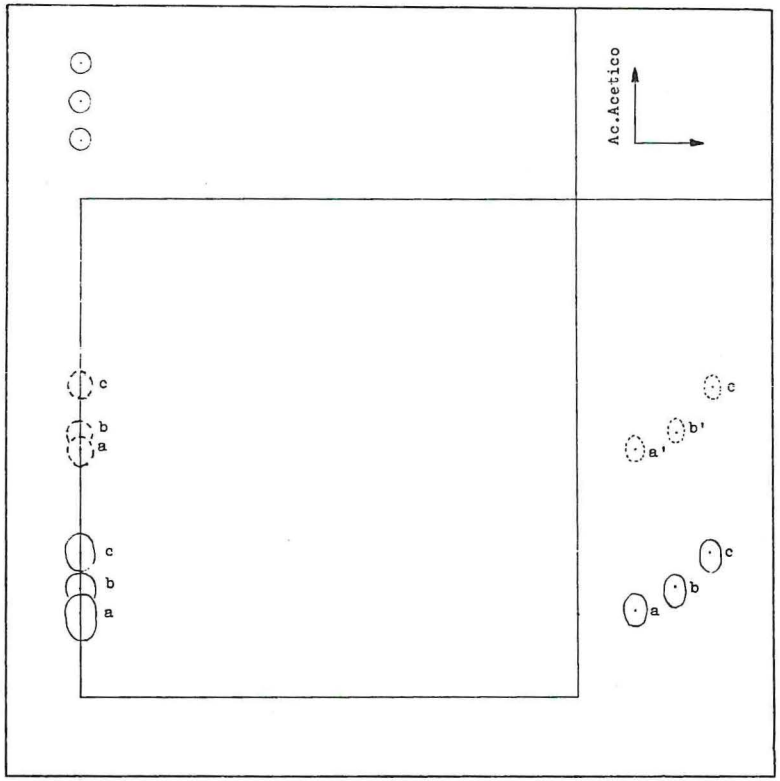
— le soluzioni in etere o in alcool di acidi cinnamici puri (prodotti Fluka) appena preparate contengono praticamente solo la forma trans;

— le soluzioni in etere o in alcool degli stessi acidi conservate alla luce diffusa normale di laboratorio a lungo (oltre 2 mesi) contengono una piccola percentuale di forma cis;

— le soluzioni in acqua degli stessi acidi tenute alla luce diffusa normale di laboratorio anche dopo pochi giorni dalla preparazione contengono già una rilevante percentuale di forma cis;

— le soluzioni in etere, in alcool o in acqua di acidi fenolici cinnamici irradiate con luce U.V. (254 mμ) dopo 2 ore contengono forti percentuali di forma cis;

— durante lo sviluppo dei cromatogrammi bidimensionali con solventi acquosi le forme isomere trans o cis separate per opera del solvente in 1ª direzione raggiungono, durante l'essicamento e l'eventuale osservazione — anche velocissima — alla luce U.V., un nuovo equilibrio messo in evidenza dal solvente in 2ª direzione (Fig. 6).



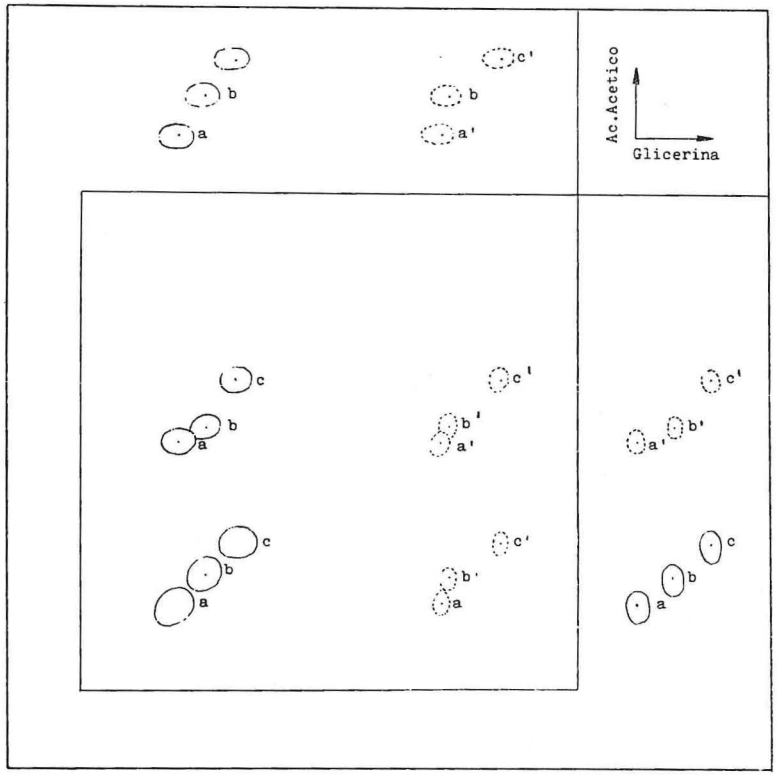


Fig. 6 - Cromatogrammi ottenuti con soluzioni di acidi fenolici (caffeico, ferulico, p-cumarico) sottoposti a irradiamento con la luce U.V. (254λ) per 30′.

Fig. 6-A Dopo sviluppo in 1ª direzione (Solvente Acido Acetico)

a - caffeico b - ferulico c - p-cumarico	trans	a′ - caffeico b′ - ferulico c′ - p-cumarico	cis

Fig. 6-B Dopo sviluppo in 1ª (Ac. Acetico) e 2ª direzione (Glicerina). Le lastre sono state osservate alla luce U.V. dopo lo sviluppo in 1ª direzione per pochi secondi.

a - caffeico b - ferulico c - p-cumarico	trans	a′ - caffeico b′ - ferulico c′ - p-cumarico	cis

Considerazioni conclusive

I risultati delle ricerche descritti in questa nota permettono di trarre le seguenti conclusioni:

1) il numero degli acidi fenolici presenti nelle uve è risultato sempre minore di quello riscontrato nei corrispondenti vini;
2) nei vini sono stati trovati sempre presenti i seguenti acidi fenolici: sei benzoici (p-ossibenzoico, protocatechico, vanillico, gallico, siringico, gentisico), tre cinnamici (p-cumarico, caffeico, ferulico) e un composto non identificato di natura fenolica;
3) non è stato possibile mettere in evidenza, nei vini esaminati la presenza, accertata invece da altri ricercatori, dell'acido salicilico (5) (6) e dell'acido clorogenico (8).
4) l'acido gentisico e il composto X sono risultati presenti soltanto nei vini e sotto forma libera e sempre assenti nelle uve;
5) le diverse modalità di esecuzione delle operazioni di estrazione e di separazione cromatografica possono determinare notevoli variazioni nelle quantità relative degli isomeri trans e cis degli acidi cinnamici presenti (caffeico, ferulico, p-cumarico).

Le fotografie sono state eseguite dal perito chimico Claudio Spessotto che ha validamente collaborato nella parte analitica.

Riassunto

Su tre tipi di vino nero, opportunamente scelti per diverso contenuto in composti antocianici, sono state eseguite ricerche cromatografiche su carta e su strato sottile di acidi fenolici, benzoici e cinnamici. E' stato messo in evidenza il comportamento cromatografico delle forme trans e cis degli acidi cinnamici.

Udine, agosto 1968.

BIBLIOGRAFIA

1 BRAY, H. G., THORPE, W. V., *Analysis of phenolic compounds of Interst in Metabolism.* In Glik, D. Methods of Biochemical Analysis. Vol. I, Interscience Publishers, 1957.

2 CANDUSSIO, R., VISINTINI-ROMANIN M., *Sostanze fenoliche di interesse alimen tare nei vini di pregio friulani.* II° Congresso regionale dell'Alimentazione. Ass. Ig. e Sanità. Udine 1968.

3 CANDUSSIO, R., VISINTINI-ROMANIN, M., *Sostanze fenoliche nei vini.* In preparazione.

4 COLOMBO, P., CORBETTA, D., PIROTTA, A., RUFFINI, G., *Paper chromatography of mixtures of phenolic compounds.* J. Chromat. 6:467, 1961.

5 GENTILINI, L., *Indagini cromatografiche sull'acido salicilico naturale nei vini.* Riv. Vit. Enol. n. 11, 1960.

6 GUIMBERTEAU, G., PORTAL, E. *Contribution a la recherche de l'acide benzoique et des acides-phenols dans les vins.* Ann. Fals. Exp. Chim. 54, 631-632, 1961.

7 YETCHE, M., JACQUIN, F., NGUYEN, D. H., URION, E., *Determination quantitative d'acides phénols par chromatographie sur papier.* Bull. Soc. Chim. Franc., 1763, 1962.

8 PIFFERI, P. G., *Studi sui pigmenti naturali.* Nota 5 . Ricerche sui flavonoidi e sui tannini estraibili dai vini con acetato di etile. Industrie Agrarie, Vol. IV, Ottobre 1965.

9 PIFFERI, P. G., *Thin-layer Chromatography on Silice Gel G of some Phenol Carboxylic Acids.* Vitis, 5:24-26, 1965.

10 RANDERATH, K., *Cromatografia su strato sottile.* Manfredi Ed. Milano 1965.

11 REIO, L., *A Methode for the paper-chromatographic separation and identification of phenol derivatives.* Chromatographic Reviews Vol. 1, 1959. Chromatographic Reviews Vol. 3, 1961.

12 RIBEREAU-GAYON, P., *Les composés phenoliques du raisin et du vin.* I. Les acides phenols. Ann. physiol. Vég. 6,2:119-147, 1964.

13 RIBEREOU-GAYON, P., *Les composés phenoliques du raisin ed du vin.* II. Les flavonosides ed les Anthocyanosides, Ann. Physiol. Vég. vol. 6,3:211-242, 1964.

14 RIBEREAU-GAYON, P., *Les composés phenoliques du raisin et du vin.* III. Les Tanins. Ann. Physiol. Vég. vol. 6,4:259-282, 1964.

15 RIBEREAU-GAYON, M. P., *Les flavonoides de la bais dans le genre « Vitis ».* C. R. Acad. Sc. Paris, t. 258, 1964.

16 RIBEREAU-GAYON, P., STONESTREET, 1., *Dosage des tanins du vin rouge et determination de leur structure.* Chimie Analyt. vol. 48,4:188-196, 1966.

17 SEIKEL, M. K., *Isolation and Identification of Phenolic Compounds in Biological Materials.* In Harborne, J. B. Biochemistry of Phenolic Compounds - Academic Pres. 1964.

18 STAHL, E., *Thin-Layer Chromatography.* Springer Verlag, 1965

19 STONESTREET, E., *Contribution à l'étude des tanins et de la matière colorante des vins rouges.* Thèse. Faculté de Sciences de l'Université de Bordeaux, 1965.

20 SUDRAUD, P., *Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges.* Ann. Technol. Agric. n. 2:203-208, 1958.

21 VAN SUMERE, C. F., *Germinations Inhibitors in plant material.* In Pridham J.B. Phenolics in Plants in Health and Disease, Pergamon Press, 1960.

22 VAN SUMERE, C. F., WOLF, G., TENCHY H. KINTY, A new *thin-layer method for phenolic substances and coumarins.* Y. Chrom. XX, 48-60, 1968.

23 VISINTINI-ROMANIN, M., *Composti fenolici di vini rossi friulani.* N.S. Staz. Chim. Agr. Sperim. di Udine. Pubb. n. 105, 1968.